基础研究

沉默信息调节因子3对肝癌细胞增殖的影响

陶 颖[1],陈 娟[2]

[1]中国人民解放军第161医院,湖北 武汉 430012;[2]重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016

摘要:目的 探讨沉默信息调节因子3(SIRT3)对肝癌细胞增殖的影响。**方法** Western blotting检测SIRT3在正常肝组织、永生化肝细胞及肝癌细胞系中的蛋白表达水平;在肝癌细胞中过表达SIRT3,台盼蓝排斥实验检测过表达SIRT3对肝癌细胞增殖的影响,EdU标记实验检测SIRT3对肝癌细胞DNA合成的影响;在肝癌细胞中过表达SIRT3,平板集落实验检测SIRT3对肝癌细胞集落形成能力的影响;qRT-PCR验证SIRT3的沉默效率,台盼蓝排斥实验检测SIRT3沉默对肝癌细胞增殖的影响,EdU标记实验检测SIRT3沉默对肝癌细胞DNA合成的影响。**结果** SIRT3在肝癌细胞系中的蛋白水平较永生化肝细胞、正常肝组织降低;SIRT3在肝癌细胞中成功过表达,过表达SIRT3使肝癌细胞增殖数目减少了约为51%~61%(P<0.001),使肝癌细胞DNA合成下降了约57%(P<0.05);过表达SIRT3抑制肝癌细胞的集落形成能力;SIRT3沉默有效,SIRT3沉默使肝癌细胞的增殖增加了约51%~61%(P<0.01),使肝癌细胞的DNA合成能力增强了137%~149%(P<0.01)。**结论** SIRT3可抑制肝癌细胞的增殖。

关键词:沉默信息调节因子3;肝癌;增殖

Role of SIRT3 in regulating proliferation of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*

TAO Ying[1], CHEN Juan[2]

[1]Department of Infectious Diseases, 161 Hospital of PLA, Wuhan 430012, China; [2]Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To explore the role of SIRT3 in regulating the proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) cells *in vitro*. **Methods** The protein expression of SIRT3 in 2 normal liver tissues, 2 immortalized hepatocyte lines, and 3 HCC cell lines was determined with Western blotting. SIRT3 overexpression and knockdown in HCC cells were induced by transfection with a vector expressing SIRT3 and a siRNA construct targeting SIRT3, respectively. The efficiency of SIRT3 overexpression and knockdown was detected by Western blot and qRT-PCR, respectively. The proliferation of the transfected HCC cells was examined using Trypan blue exclusion assay, and the cellular DNA synthesis was tested using EdU incorporation assay. The colony-forming ability of the cells was analyzed by colony formation assays. **Results** SIRT3 expression was significantly lower in the 3 HCC cell lines than in immortalized hepatocytes and normal liver tissues. SIRT3 overexpression in HCC cells significantly lowered the cell proliferation by 51%-61% (P<0.001), reduced cellular DNA synthesis by 57% (P<0.05), and inhibited colony formation of the cells. SIRT3 knockdown significantly increased the proliferation of HCC cells by 51%-61% (P<0.01) and enhanced DNA synthesis by 137%-149% (P<0.01). **Conclusion** SIRT3 plays a inhibitory role in regulating the proliferation of HCC cells *in vitro*.

Key words: SIRT3; hepatocellular carcinoma; apoptosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球范围内的多发性肿瘤,也是我国常见的恶性肿瘤,死亡率居我国恶性肿瘤的第2位[1]。每年约有630 000例肝癌新发病人,其中一半以上发现在中国[2]。Sirtuin家族是近来发现的依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD+)的第Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶[3]。人类sirtuin家族有7个成员,即SIRT1~7。他们的主要功能有:参与细胞衰老[4]、凋亡[5]、分化[6]、应激[7]及能量代谢[8]等。越来越多的证据表明,Sirtuin家族与肿瘤有着密切的联系[9]。沉默信息调节因子3(SIRT3)是线粒体内主要的去乙酰化酶,广泛分布于成人和胚胎组织。作为一种线粒体蛋白,SIRT3在能量生成[8]、代谢[10]、细胞老化[11]、细胞凋亡[12]和细胞内信号控制[13]等方面发挥着重要作用,且其在肿瘤方面的作用也逐渐受到重视。但SIRT3在癌症中的作用倍受争议,曾有文献报道[14],SIRT3缺失的小鼠成纤维细胞表现出了线粒体异常,并增加了应激诱导的基因组不稳定性,且细胞易发生癌变。另一些文献报道了,SIRT3在一些癌症中呈现高水平的表达[15-17]。SIRT3在不同肿瘤进展

收稿日期:2015-09-21

基金项目:国家自然科学基金(81472271,81201282)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81472271, 81201282).

作者简介:陶 颖,硕士,住院医师,E-mail: yingzi.1113@163.com

通信作者:陈 娟,博士,教授,E-mail: yixin_xinyuan@163.com

中的作用不同可能与肿瘤细胞类型和SIRT3在不同信号通路中的作用不同有关。目前,对于SIRT3在肝癌发生发展过程中的作用研究较少,因此明确SIRT3在肝癌细胞增殖中的作用,对进一步深入研究SIRT3对肝癌进展的影响、分析其分子机制、寻找肝癌治疗的分子靶向药物等具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

SK-Hep-1、PLC5、SMCC-7721及MIHA细胞系购于ATCC(American Type Culture Collection)。L02来自Prof.Nathalie Wong(香港中文大学)。pcDNA3.1及SIRT3质粒购于Addgene公司,siRNA购于RIBOBIO公司。SIRT3抗体(#3627)购于Cell Signaling Technology公司。辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG购于GE公司。GAPDH及辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG购于中杉金桥公司。BCA试剂盒购于碧云天公司。逆转录试剂盒FastQuant RT Kit(with gDNase)购于TIANGEN公司,SYBR Green购于Roche公司。Click-iT EdU Imaging Kits购于Life Technologies,Invitrogen。质粒转染试剂购买自Roche公司。siRNA转染试剂购于QIGEN公司。

1.2 方法

1.2.1 *细胞培养* 以上细胞均培养于含有10% FBS,1% p/s的DMEM培养基中,在含5% CO_2、37 ℃孵箱中常规培养。质粒转染和siRNA转染严格按照试剂说明书操作。

1.2.2 Western blotting 用RIPA裂解液使肝组织及细胞充分裂解,16 000 *g*离心5 min并取上清于新的EP管中。BCA试剂盒测蛋白浓度,SDS-PAGE凝胶电泳,每孔上样量为30 μg蛋白,将蛋白转至NC膜(RPN303D, GE公司),5%脱脂牛奶封闭1 h,一抗4 ℃摇床孵育过夜(SIRT3抗体:BSA=1∶3000),二抗室温孵育2 h。以GAPDH为内参。

1.2.3 qRT-PCR 细胞转染3 d后,提取RNA,逆转录RNA成cDNA,并同时去除基因组DNA,随后使用FastStart Universal SYBR Green Master Mix进行qPCR,以β-actin为内参。每组实验重复3次。以$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算目的基因的相对表达水平。

1.2.4 *台盼蓝排斥实验* 转染后3、4、5 d后进行台盼蓝细胞计数。40 μL细胞悬液加40 μL台盼蓝染液,用枪头吹打混匀后,吸取10 μL加入到计数板内,罗氏自动化细胞计数系统Cedex XS机器读数。并收集细胞以Western blotting进行过表达验证。

1.2.5 *平板集落实验* 转染24 h后换液时,加入含有300 μ/mL G418的新培养基。3孔为pcDNA3.1组,3孔为SIRT3组。每3 d换液1次,细胞长至50%以上,重新传代,3周时观察到明显的集落,进行结晶紫染色。

1.2.6 *EdU标记实验* 将SMMC-7721细胞12×10[4]接种于含无菌盖玻片的6孔板中,24 h后转染质粒或siRNA,3 d后运用Click-iT EdUImaging Kits进行EdU标记实验,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.2.7 *统计分析* 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,对两样本均数间比较采用配对*t*检验,多样本间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用两因素方差分析检验。以$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SIRT3在肝组织及不同细胞中的表达差异

收集正常肝组织2例,提取总蛋白;提取永生化肝细胞MIHA、L02,肝癌细胞SK-Hep-1、SMMC-7721、PLC5的总蛋白。Western blotting检测SIRT3的蛋白表达水平,结果显示SIRT3在肝癌细胞系中的表达量明显低于正常肝组织和永生化肝细胞(图1)。

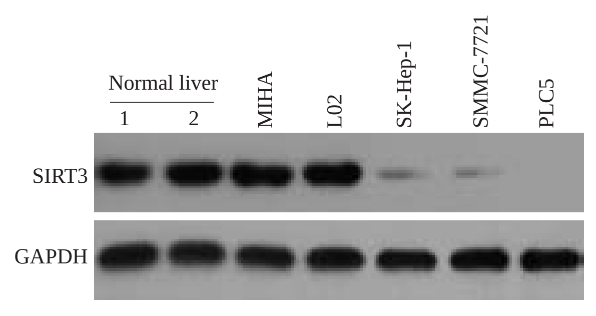


图1 Western blotting显示SIRT3在正常肝组织、永生化肝细胞、肝癌细胞系中的蛋白表达水平

Fig.1 Expression levels of SIRT3 protein in normal liver tissues, immortalized hepatocyte and HCC cell lines detected by Western blotting.

2.2 SIRT3过表达对肝癌细胞增殖的影响

我们首先在SMMC-7721、PLC5这两种肝癌细胞系中成功的过表达SIRT3,Western blotting检测过表达效率(图2A)。并在此基础上进行台盼蓝排斥实验,结果显示SIRT3过表达对SMMC-7721细胞增殖的抑制率在第3、4、5天分别为61%、59%、53%(图2B,$P<0.05$);SIRT3过表达对PLC5细胞增殖的抑制率在第3、4、5天分别为59%、51%、54%(图2B,$P<0.05$);同时,我们在SMMC-7721上进行了EdU标记实验,结果显示过表达SIRT3使肝癌细胞中的DNA合成能力较对照组下降了57%(图2C,$P<0.05$)。揭示SIRT3过表达明显抑制了肝癌细胞增殖。

2.3 SIRT3过表达对肝癌细胞克隆形成能力的影响

在SMMC-7721中过表达SIRT3,并以0.2 μmol/L嘌呤霉素处理培养2周,结晶紫染色。结果显示与pcDNA3.1组相比,SIRT3过表达组中肝癌细胞集落数

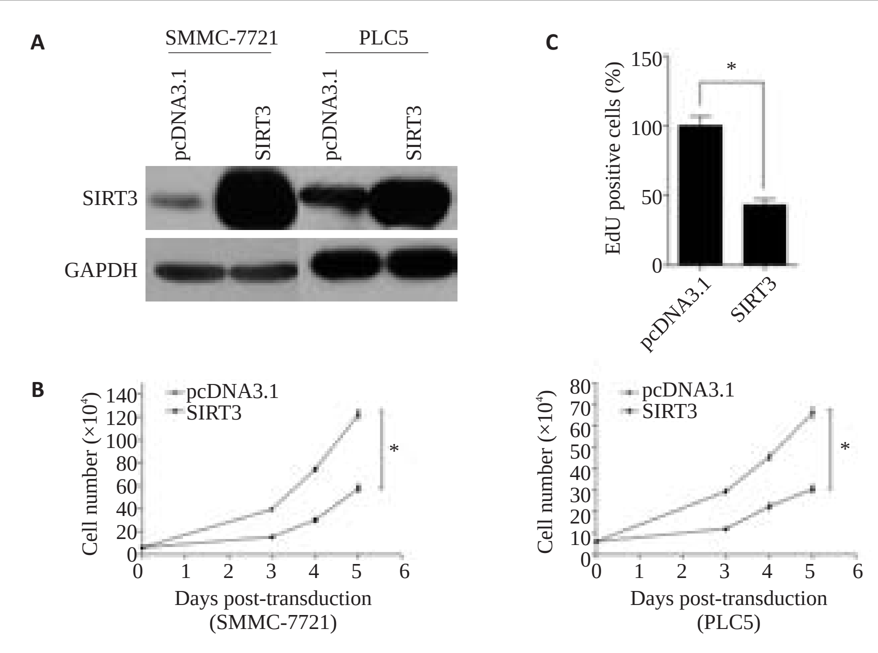


图2 SIRT3过表达对肝癌细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of SIRT3 overexpression on proliferation of HCC cells. *A*: Western blotting for detecting overexpression of SIRT3 in transfected SMMC-7721 and PLC5 cells; *B*: Trypan blue exclusion experiment showing the changes in proliferation of SMMC-7721 and PLC5 cells following the transfection. **P*<0.05 *vs* pcDNA3.1 group. *C*: Effect of SIRT3 overexpression on DNA synthesis of SMMC-7721 cells tested by EdU incorporation assay. **P*<0.05 *vs* pcDNA3.1 group.

目明显降低，提示着SIRT3过表达可显著抑制肝癌细胞的集落形成能力（图3）。

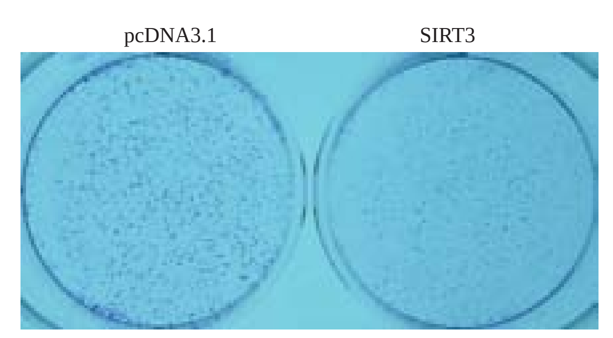


图3 集落形成实验检测过表达SIRT3对肝癌细胞集落形成能力的影响

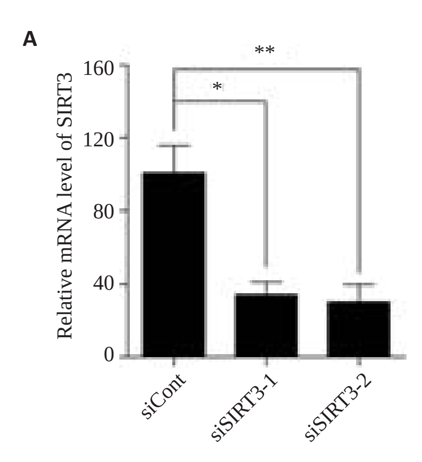
Fig.3 Colony-forming assay of HCC cells overexpressing SIRT3.

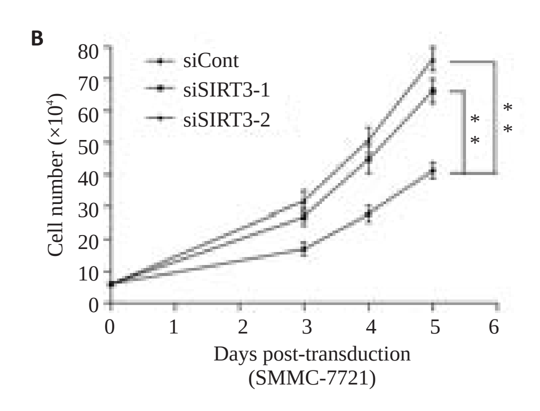
2.4 SIRT3沉默对肝癌细胞增殖的影响

我们首先在SMMC-7721细胞中转染了靶向沉默SIRT3的siRNA和siCont，qRT-PCR证实SIRT3的沉默是有效的（图4A），siSIRT3-1的沉默效率约为65%（*P*<0.05），siSIRT3-2的沉默效率约为70%（*P*<0.01）。在SIRT3沉默的基础上，通过台盼蓝排斥实验分析发现转染siSIRT3-1使SMMC-7721细胞增殖在第3、4、5天分别增加了59%、61%、61%（图4B，*P*<0.01），转染siSIRT3-2使SMMC-7721细胞增殖在第3、4、5天分别增加了55%、51%、53%（图4B，*P*<0.01），同时，通过EdU标记实验检测也发现siSIRT3-1、siSIRT3-2使SMMC-7721细胞的DNA合成能力分别增加了137%、149%，揭示着SIRT3沉默明显促进了SMMC-7721中的DNA合成能力（图4C，*P*<0.01）。这些结果证实SIRT3沉默可以明显促进肝癌细胞增殖。

3 讨论

近年来，SIRT3的作用逐渐受到人们的关注，SIRT3通过去乙酰化SOD2的2个关键的赖氨酸残基，促进了SOD2的抗氧化活性[18]，SIRT3也能够去乙酰化MnSOD赖氨酸122，诱导其活性[19]，从而调节了细胞氧化应激反应。有研究表明[20] SIRT3通过去乙酰化Ku，促进Ku70-Bax的相互作用，调节了细胞凋亡。也有文献报道[21]SIRT3抑制P53的活性，参与了细胞周期和老化的调节。此外，SIRT3能调节肿瘤发生的不同进程，如细胞能量代谢失控，基因组不稳定性增加，促肿瘤炎症反应等，并在一些肿瘤中起着双重调节的作用，对口腔癌、纤维肉瘤、宫颈癌、淋巴结阳性的乳腺癌、膀胱癌，SIRT3起促进肿瘤发生的作用，而在结肠癌、骨肉瘤、早期乳腺癌、白血病中，起抑制肿瘤发生的作用[22]。因此，SIRT3在不同的肿瘤组织中有着不同的功能，这种功能具有细胞和肿瘤特异性。而目前有关于SIRT3在肝癌中的报道还很少。





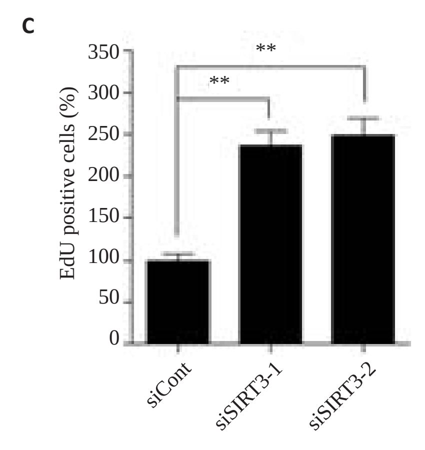


图4 SIRT3沉默对肝癌细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of SIRT3 knockdown on HCC cell proliferation. *A*: QRT-PCR for detecting the knockdown efficiency of SIRT3. *P<0.05, **P<0.01 *vs* siCont group; *B*: Effect of SIRT3 knockdown on SMMC-7721 cell proliferation. **P<0.01 *vs* siCont group; *C*: Effect of SIRT3 knockdown on DNA synthesis in SMMC-7721 cells. **P<0.01 *vs* siCont group.

本研究表明,SIRT3在肝癌细胞系中的表达量明显低于正常肝组织及永生化肝细胞。而在过表达SIRT3后,台盼蓝排斥实验检测明显观察到肝癌细胞的生长受到了抑制。EdU标记实验检测显示过表达SIRT3使得肝癌细胞的DNA合成能力显著减弱,进一步提示了SIRT3可抑制肝癌细胞的增殖。此外,平板集落实验显示过表达SIRT3可显著减弱肝癌细胞的集落形成能力。最后,我们在肝癌细胞中沉默SIRT3后发现肝癌细胞的增殖能力和DNA合成能力都显著增强。目前许多研究关注于SIRT3对不同肿瘤细胞增殖作用的机制研究,在胃癌进展中,SIRT3通过下调Notch-1的表达抑制了胃癌细胞增殖[23];在胰腺肿瘤发生中,SIRT3通过调节GOT2的乙酰化状态,抑制了细胞氧化应激反应,促进了胰腺肿瘤细胞增殖[24];在非小细胞肺癌发展中,SIRT3去乙酰化NMNA2,调节了细胞能量代谢,有利于细胞增殖[25]。从这些报道中发现SIRT3通过不同的信号通路对肿瘤细胞增殖有着不同的调节作用,下一步我们也将从氧化应激反应、能量代谢、凋亡等方面研究SIRT3影响肝癌细胞增殖的分子机制。肿瘤的发生是一个多基因、多步骤的过程,其中恶性增殖能力是肿瘤细胞的重要表型。我们从SIRT3过表达和沉默两个方面证实了SIRT3可抑制肝癌的增殖。因此,本研究对明确SIRT3对肝癌发生发展的作用,鉴定新的治疗肝癌的分子药物靶点具有重要的意义。

参考文献:

[1] Yuen MF, Hou JL, Chutaputti A, et al. Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(3): 346-53.

[2] Ding J, Wang H. Multiple interactive factors in hepatocarcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2014, 346(1): 17-23.

[3] Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase[J]. Nature, 2000, 403(6771): 795-800.

[4] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(2): 143-53.

[5] Lin Z, Yang H, Kong Q, et al. USP22 antagonizes p53 transcriptional activation by deubiquitinating Sirt1 to suppress cell apoptosis and is required for mouse embryonic development[J]. Mol Cell, 2012, 46(4): 484-94.

[6] Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function[J]. Biochem J, 2007, 404(1): 1-13.

[7] Paraíso AF, Mendes KL, Santos SH. Brain activation of SIRT1: role in neuropathology[J]. Mol Neurobiol, 2013, 48(3): 681-9.

[8] Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? [J]. Int J Biol Sci. 2009, 5(2): 147-52.

[9] Hall JA, Dominy JE, Lee Y, et al. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies[J]. J Clin Invest, 2013, 123(3): 973-9.

[10] Hirschey MD, Shimazu T, Huang JY, et al. SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011, 76: 267-77.

[11] Giralt A, Villarroya F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial

functions: metabolism, cell death and aging[J]. Biochem J, 2012, 444(1): 1-10.

[12] Marfe G, Tafani M, Indelicato M, et al. Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines *via* Akt inactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction [J]. J Cell Biochem, 2009, 106(4): 643-50.

[13] Jing E, Emanuelli B, Hirschey MD, et al. Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling *via* altered mitochondrial oxidation and reactive Oxygen species production[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(35): 14608-13.

[14] Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress[J]. Cancer Cell, 2010, 17(1): 41-52.

[15] Ashraf N, Zino S, Macintyre A, et al. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer[J]. Br J Cancer, 2006, 95(8): 1056-61.

[16] Alhazzazi TY, Kamarajan P, Joo N, et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer[J]. Cancer, 2011, 117(8): 1670-8.

[17] Zhao Y, Yang H, Wang X, et al. Sirtuin-3 (SIRT3) expression is associated with overall survival in esophageal cancer[J]. Ann Diagn Pathol, 2013, 17(6): 483-5.

[18] Qiu X, Brown K, Hirschey MD, et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation [J]. Cell Metab, 2010, 12(6): 662-7.

[19] Tao R, Coleman MC, Pennington JD, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress[J]. Mol Cell, 2010, 40(6): 893-904.

[20] Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, et al. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(20): 6384-401.

[21] Li S, Banck M, Mujtaba S, et al. p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10486.

[22] Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, et al. SIRT3 and cancer: Tumor promoter or suppressor?[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1816(1): 80-8.

[23] Wang L, Wang WY, Cao LP. SIRT3 inhibits cell proliferation in human gastric cancer through down-regulation of Notch-1[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(4): 5263-71.

[24] Yang H, Zhou L, Shi Q, et al. SIRT3-dependent GOT2 acetylation status affects the malate-aspartate NADH shuttle activity and pancreatic tumor growth[J]. EMBO J, 2015, 34(8): 1110-25.

[25] Li H, Feng Z, Wu W, et al. SIRT3 regulates cell proliferation and apoptosis related to energy metabolism in non-small cell lung cancer cells through deacetylation of NMNAT2[J]. Int J Oncol, 2013, 43(5): 1420-30.

（编辑:经 媛）